

УДК (577.175.444+5777.175.534): 597-111.11: 639.371.03

ДИНАМИКА ЦИКЛИЧЕСКОГО АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА В РАПНЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ ОСЕТРА *ACIPENSER GULDENSTAEDTI* BRANDT

© 2008 г. Н.Е. Бойко

Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства, Ростов-на-Дону 344002

Поступила в редакцию 05.03.2007 г.

Окончательный вариант получен 19.05.2007 г.

У предличинок и личинок осетра *Acipenser gueldenstaedti* Brandt в возрасте 2-20 суток изучали динамику содержания циклического аденозинмонофосфата (сАМР) и изменение уровней сАМР после однократного воздействия на предличинки тироксином (Т4) и кортизолом. Базальные уровни сАМР за исследуемый период оказались наименьшими в возрасте 2 дня (стадия 38), а наиболее высокими в возрасте 8 дней (стадия 43). Т4 у двухдневных личинок снижал содержания сАМР и увеличивал на 9-е сутки. Статистически достоверное повышение концентрации сАМР вызывала обработка одновременно Т4 и кортизолом. Динамика сАМР отражает период функциональной активности тиреоидных гормонов и кортизола у личинок осетра.

Предличиночный период развития осетровых рыб достаточно продолжителен (10-12 дней) и завершается переходом от желточного к дефицитивному способу питания. Согласно морфологическим исследованиям он характеризуется прогрессивным и непрерывным формированием видовых анатомических признаков (Детлаф и др., 1981), проявлением функциональной активности желез внутренней секреции, в частности, щитовидной (Яковлева, 2000) и интерреналовой (Баранникова, 1974) желез, элементов сенсорной (Пяткина, 1991) и нейроэндокринной систем (Яковлева, 2000). В эти сроки содержание в тканях тиреоидных гормонов весьма значительно колеблется с резким снижением на второй-третий дни развития (ст. 38-39) и максимальными показателями на 8-10 дни, незадолго до перехода на активное питание (ст. 43-44). Максимум кортизола приурочен к тем же стадиям, что и рост тироксина (Boiko et al., 2002). Предличинки осетра проявляют чувствительность к тиреоидным гормонам и кортизолу, а функциональный ответ организма на гормональное воздействие меняется с их возрастом (Бойко, 2004). О существовании у личинок осетра гормонозависимого чувствительного периода, связанного с адаптивными процессами, свидетельствуют также данные поведенческих исследований (Бойко и др., 1993; Бойко, Григорьян, 2002).

Одной из особенностей периода, определяющего направленность процессов развития у рыб, является резкое увеличение концентрации в крови тиреоидных гормонов (тироксина) и кортизола (Miwa et al., 1988), что хорошо диагностируется у видов, проходящих метаморфоз. Поскольку определение содержания гормонов у личинок осетра технически возможно только в целом организме, включая эндокринные железы, для уточнения временных границ этого «критического» периода использовали дополнительные биохимические свидетельства сопряженности тканевого гормонального статуса с функциональными изменениями в организме. Импульсом для изменений в ответ на действие гормонов является увеличение концентрации «вторичных мессенджеров», в частности, циклического аденозинмонофосфата (сАМР). Молекула регулирует работу клеток, фосфорилируя белки (ферменты, рецепторы гормонов, факторы транскрипции), а реализация той или иной программы в каждом случае зависит не только от стимулирующего агента, но

и от типа ткани (Daniel et al., 1998). У личинок осетра нами впервые прослежена динамика содержания сАМР, а также изменение сАМР после обработки личинок тиреоидными гормонами и кортизолом.

Исследование выполняли на личинках русского осетра *Acipenser gueldenstaedti* Brandt возрастом от 2 до 20 дней, выращиваемых в лабораторных условиях. Базальные уровни сАМР определяли у личинок в возрасте 2, 3, 8, 9, 10 и 20 дней. Для гормональной стимуляции использовали растворы левотироксина натрия (Berlin chemie) и гидрокортизон-ацетата (RENAL), в которые погружали личинок на 1 час. Концентрации обрабатывающих растворов выбирали с учетом результатов предыдущих исследований (Бойко, 2004). Эксперимент включал контрольный и следующие опытные группы: Т4 (1,5 мг/л) на стадии 38 (2-й день), ст. 44 (9-й день); Т4 (1,5 мг/л)+кортизол (30 мг/л), на стадии 44 (9-й день). Отбор проб производили немедленно после обработки, через 24 часа и у личинок в возрасте 20 дней. Определение уровней сАМР в экстрактах тканей производили радиоиммунологическим методом наборами фирмы Immunotech (Франция). Данные представлены в пкмоль на 1 мг белка. Для статистической обработки данных использовали t-критерий Стьюдента. Уровень достоверности $p < 0,05$ был принят за значимый.

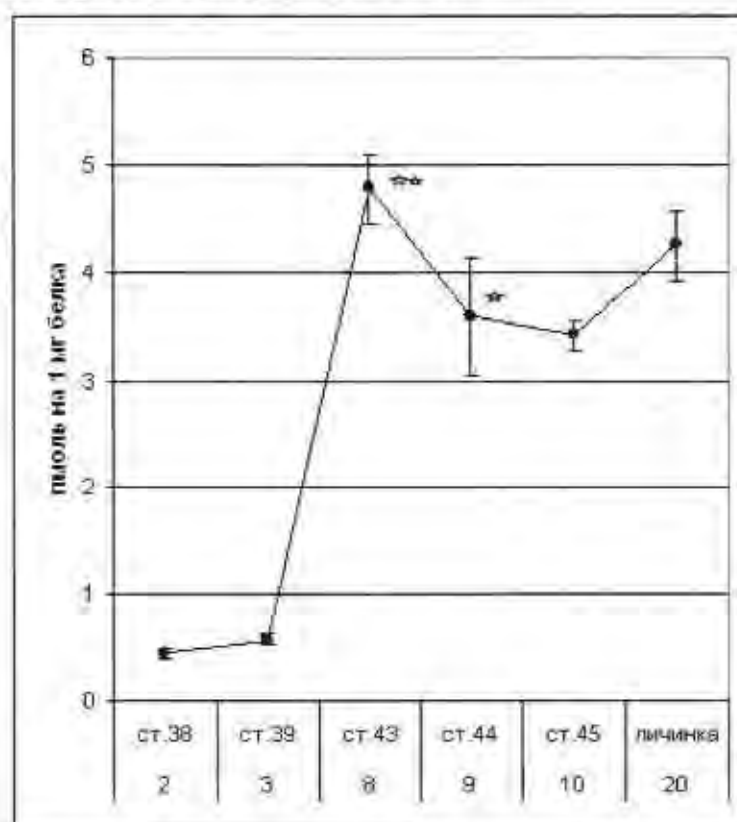


Рис. Базовая динамика содержания сАМР в тканях личинок осетра.

По оси абсцисс – стадии развития предличинки (36, выклев, 45, начало активного питания) и возраст (дни) от выклева. По оси ординат – содержание сАМР, пкм на 1 мг белка. (**) – различия достоверны при $p < 0,001$; (*) – различия достоверны при $p < 0,05$.

Fig. The basal dynamics of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) observed in sturgeon larvae tissue.

Axis of abscissae – stages of development (36, hatching, 45, beginning of active feeding) and days after hatching. Ordinate axis – cAMP content, pmol per mg of protein content. (**) – reliable differences, $p < 0,001$; (*) – reliable differences, $p < 0,05$.

Согласно полученным данным, в раннем онтогенезе осетра чередовались периоды с высокими и низкими базовыми уровнями циклического аденозинмонофосфата. На второй-третий дни после выклева из оболочек (ст. 38-39) уровень cAMP в расчете на мг белка составил всего $0,45 \pm 0,02$ пмоль – $0,57 \pm 0,03$ пмоль. Но на восьмой день (ст. 43) уровни уже достигли значений $4,88 \pm 0,4$ пмоль/мг белка ($p < 0,001$) и к ст. 45 уменьшились до $3,40 \pm 0,13$ пмоль/мг белка. К 20-му дню после выклева (личиночный этап развития) уровень cAMP составил $4,25 \pm 0,5$ пмоль/мг белка ($p < 0,05$) (рис.).

Анализ содержания cAMP у предличинок осетра показал соответствие с динамикой тироксина и кортизола и также чувствительность к обработке гормонами (табл.). Обнаружена зависимость эффекта гормонального воздействия от стадии развития, поскольку увеличение циклического нуклеотида в ответ на гормональную обработку наблюдалось только в период высоких базальных уровней cAMP, но не в период низких. Если у двухдневных личинок (ст. 38) T4 вызывало стойкое снижение концентрации циклического аденозинмонофосфата, то на стадии 44 в ответ на обработку T4 наблюдалось некоторое увеличение cAMP. Реакция еще более усиливалась ($p < 0,05$) если производили обработку предличинок одновременно T4 и кортизолом. Известно, что синтез cAMP обеспечивает аденилатциклаза через активацию мембранно-связанной сериновой протеиназы. Уровень активности некоторых протеиназ у предличинок осетровых рыб изменяется в соответствии с уровнем тироксина и также имеет волнообразный характер (Плотников, Проскуряков, 1984). Кроме того, активизацию сериновой протеиназы вызывает кратковременная обработка личинок рыб тиреоидными гормонами и кортизолом (Kim, Brown, 1997).

Таблица. Изменение содержания cAMP после часовой обработки личинок осетра тироксином (T4) и кортизолом.

Table. Fluctuating cAMP level after a one-hour tyroxine (T4) and cortisol treatment.

Время определения после обработки	Обработка		
	T4 2-й день, стадия 38	T4 9-й день, стадия 44	T4+кортизол 9-й день, стадия 44
	cAMP, пмоль/мг белка		
Немедленно	<u>$0,28 \pm 0,004^*$</u>	<u>$3,45 \pm 0,14$</u>	<u>$3,70 \pm 0,31$</u>
	$0,45 \pm 0,021$	$3,58 \pm 0,54$	$3,58 \pm 0,54$
Через 24 часа	<u>$0,45 \pm 0,03^*$</u>	<u>$3,70 \pm 0,14$</u>	<u>$4,05 \pm 0,24^*$</u>
	$0,57 \pm 0,03$	$3,40 \pm 0,13$	$3,40 \pm 0,13$
В возрасте 20 дней	<u>$4,22 \pm 0,14$</u>	<u>$4,23 \pm 0,33$</u>	<u>$4,36 \pm 0,24$</u>
	$4,25 \pm 0,05$	$4,25 \pm 0,05$	$4,25 \pm 0,05$

Примечание: (*) – различия достоверны при $p < 0,05$. Выше горизонтальной черты – опыт, ниже – контроль.

Note: (*) – reliable differences, $p < 0,05$. Upwards of horizontal line – experiment, below – control.

Одной из возможных причин, тормозящих образование cAMP в тканях осетра на самых ранних стадиях развития, могла быть рефрактерность вследствие незрелости механизмов, отвечающих за образование аденилатциклаз или инактивация высокими концентрациями гормона, поскольку первым этапом процесса изменения содержания cAMP является взаимодействие гормона с рецептором клеточной мембраны (Hulbert, 2000). К концу периода предличиночного развития, (ст. 44) рецепторная система, вероятно, является достаточно зрелой, чтобы адекватно реагировать на повышение уровня гормонов.

В более позднем возрасте (20 дней со дня выклева) личинок гормональная обработка на ранних стадиях не привела к изменению содержания cAMP по сравнению с контролем.

Это было ожидаемым результатом, учитывая сигнальную функцию нуклеотида и зависимость эффективности проведения сигнала от способности к его гашению (Oppenheimer, Schwartz, 1997). В то же время, это не исключает возможных изменений базальных уровней нуклеотида в отдельных тканях, например, клетках крови. Известно, что содержание сАМР в лейкоцитах возрастает по мере их зрелости (Bach, 1975). По нашим данным доля зрелых лейкоцитов увеличивается у обработанных гормонами предличинкок осетра на стадии активного питания (Бойко, 2004).

Известно участие сАМР-зависимых реакций в модуляции следовых процессов в нервной системе. В сенсорных нейронах, и нейронах ЦНС агенты, способствующие усилению синтеза сАМР, не только являются нейротрофическими, но и стимулируют изменения, составляющие структурную основу долговременной памяти и социального поведения (Walton et al., 1999). Применительно к личинкам осетровых рыб это подтверждается возможностью формирования долговременной памяти на химический стимул только во второй половине предличинпочного развития (Бойко и др., 1993; Бойко, Григорьян, 2002).

Таким образом, у предличинкок осетра изменение уровней сАМР может быть расценено как функциональный ответ организма на запрограммированное изменение тканевых концентраций гормонов. Уровень зрелости регуляторных механизмов, к которым в том числе, принадлежит и система, обеспечивающая образование сАМР, возможно, является одним из факторов позволяющим осуществлять гормональную модификацию некоторых адаптивных процессов у осетра лишь в конце предличинпочного этапа развития.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баранникова И.А. Некоторые особенности формирования нейросекреторных систем и становления эндокринных функций в онтогенезе рыб // Гормональные факторы индивидуального развития. М.: Наука, 1974. С. 61-70.
- Бойко Н.Е. Изучение последствий тиреоидных гормонов и кортизола на рост, тиреоидный статус и показатели крови молоди осетра // Вопросы рыболовства. 2004. Т. 5. №3. С. 500-513.
- Бойко Н.Е., Григорьян Р.А., Чихачев А.С. Обязательный импринтинг молоди осетра // Журнал эвол. биохим. и физиол. 1993. Т. 29. № 5-6. С. 509-514.
- Бойко Н.Е., Григорьян Р.А. Влияние тиреоидных гормонов на запечатление химических сигналов в раннем онтогенезе осетра *Acipenser gueldenstedti* Brandt // Журнал эвол. биохим. и физиол. 2002. Т. 38. №2. С. 169-172.
- Детлаф Т.А., Гинзбург А.С., Шмальгаузен О.И. Развитие осетровых рыб М.: Наука, 1981. 224 с.
- Плотников Г.К., Проскуряков М.Т. Пищеварительные ферменты рыб на ранних стадиях онтогенеза // Журнал эвол. биохим. и физиол. 1984. Т. 20. №1. С. 21-25.
- Пяткина Г.А. Развитие обязательных рецепторов у личинок осетровых рыб // Сенсорные системы. 1991. Т. 5. С. 34-42.
- Яковлева И.В. Нейроэндокринологические аспекты раннего онтогенеза круглоротых и рыб. СПб.: Петрополис, 2000. 131 с.
- Bach M.A. Differences in cyclic AMP changes after stimulation by prostaglandins and isoproterenol in lymphocyte subpopulations // J. Clin. Invest. 1975. V. 55. №5. Pp. 1074-1081.

Boiko N.E., Kornienko G.G., Vorobyeva O.A. Cortisol and thyroid hormones at early stages of the development of the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedti* Brandt // J. Environmental Protection and Ecology. 2002. V. 3, №3. Pp. 678-681.

Daniel P.B., Walker W.H., Habener J.F. Cyclic AMP signaling and gene regulation // Annu. Rev. Nutr. 1998. V. 18. Pp. 353-383.

Hulbert A.J. Thyroid hormones and their effects: a new perspective // Biol. Rev. 2000. V. 75. Pp. 519-631.

Kim B.G., Brown C.L. Hormonal manipulation of digestive enzyme ontogeny in marine larval fishes - effects on digestive enzymes // UJNR Technical Report. 2002. №28. Pp. 47-55.

Miwa S., Tagawa M., Inui Y., Hirano T. Thyroxine surge in metamorphosing flounder larvae // Gen. Comp. Endocrinol. 1988. V. 70. Pp. 158-163.

Oppenheimer J.H., Schwartz H.L. Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development // Endocrine Reviews. 1997. V. 18. №4. Pp. 462-475.

Walton M., Woodgate A., Muravlev A., Xu R., During M.J., Dragunow M. CREB phosphorylation promotes nerve cell survival // J. Neurochem. 1999. V. 73, №5. Pp. 1836-1842.

THE DYNAMICS OF CYCLIC ADENOSINMONOPHOSPHATE AT EARLY STAGES OF THE DEVELOPMENT OF THE STURGEON, *ACIPENSER GUELLENSTAEDTI* BRANDT

© 2008 y. N.E. Boiko

Research Institute of the Azov Sea Fishery Problems, Rostov-on-Don

The dynamics of cyclic adenosinmonophosphate (cAMP) and cAMP level changes after a one-hour thyroxine (T₄) and cortisol treatment were studied at the sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti* Brandt) protolarvae and mesolarvae at the age from 2 up to 20 days. Basal cAMP levels were the least at the age 2 days (stage 38) and reached the highest rates at the age 8 days (stage 43). T₄ treatment decreased the cAMP level at the age 2 days and stimulated in 9 days. A statically reliable increase of cAMP concentration was observed after T₄ and cortisol treatment. The cAMP dynamics in sturgeon prelarvae represents a period of functional activity of thyroid hormones and cortisol.